

## الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و پلاسمیدی سویه‌های پseudomonas آئروژینوزای جدا شده از عفونت‌های بیماران بستری در مرکز آموزشی و درمانی سینا- تبریز

دکتر محمدرضا نهایی<sup>۱</sup>، رضا بهلولی خیاوی<sup>۲</sup>، دکتر محمد اصغرزاده<sup>۳</sup>، دکتر آلکا حسنی<sup>۴</sup>، جاوید صادقی<sup>۵</sup>

محمد اکبری دیپاور<sup>۵</sup>

<sup>۱</sup> نویسنده مسئول: استاد گروه میکروب شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تبریز E-mail: nahaeimr@tbzmed.ac.ir  
<sup>۲</sup> کارشناس ارشد میکروب شناسی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل <sup>۳</sup> استادیار فر آورده های بیولوژیک <sup>۴</sup> استادیار میکروب شناسی <sup>۵</sup> کارشناسان ارشد میکروب شناسی گروه آموزشی میکروب شناسی دانشکده پزشکی و مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

### چکیده

**زمینه و اهداف:** پseudomonas آئروژینوزا یک پاتوژن مهم بیمارستانی است که مقاومت آنتی بیوتیکی زیادی را نشان می دهد. برای مطالعه اپیدمیولوژیک پseudomonas آئروژینوزا روش های فنوتایپینگ مثل تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و ژنوتایپینگ مثل آنالیز الگوی پلاسمیدی وجود دارد. آنالیز پلاسمیدی اطلاعات مفیدی را در مورد منشاء اپیدمی و تعداد کلون های متفاوت موجود در یک اپیدمی بدست می دهد، لذا جهت مطالعه الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و پلاسمیدی سویه های پseudomonas آئروژینوزا در عفونت های بیماران بستری شده در مرکز آموزشی و درمانی سینای تبریز این تحقیق انجام شد تا ارتباط اپیدمیولوژیک بین سویه های جدا شده مورد بررسی قرار گیرد.

**روش کار:** این مطالعه بر روی ۱۳۵ سویه پseudomonas آئروژینوزا جدا شده از بیماران با عفونت های مختلف بستری در مرکز آموزشی و درمانی سینای تبریز انجام گرفت. برای تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی از روش انتشار دیسک در آگار و برای استخراج پلاسمید از روش لیز قلیایی تغییر یافته استفاده شد. جهت شناسایی باندهای supercoiled از open circular و linear از روش الکتروفورز دوبعدی استفاده شد. برای برش پلاسمیدها دو آنزیم محدودالتر EcoRI و HincII بکار گرفته شدند.

**یافته ها:** از تعداد ۱۳۵ سویه پseudomonas آئروژینوزا ایزوله شده از بیماران با عفونت های مختلف تست حساسیت به آنتی بیوتیک ها بعمل آمد و الگوی پلاسمیدی تعیین گردید. میزان مقاومت به آزترونام ۷۷٪، کولیستین ۷۴٪، سفنازیدیم ۶۹٪، پپراسیلین ۶۷٪، اوپلوکساسین ۶۲٪، توپراماسین ۵۶٪، کاربنی سیلین ۵۴٪، جنتامایسین ۵۱٪، سیپروفلوکساسین ۲۲٪، آمیکاسین ۱۵٪، پلی میکسین B ۱۳٪ و ایمی پنم ۲٪ بود. از ۱۳۵ سویه ۶۸ سویه (۵۰/۴٪) فاقد هر نوع پلاسمید بودند و در ۶۷ سویه باقیمانده (۴۹/۶٪) تا ۶ پلاسمید شناسایی شد. وزن مولکولی پلاسمیدهای جدا شده عمدتاً در محدوده ۰/۵kb تا ۲۱kb و تعدادی بیش از ۲۱ kb بود. از مجموع ۶۷ سویه دارای پلاسمید، ۲۸ الگوی پلاسمیدی بدست آمد که الگوهای مشابه در ایزوله های مربوط به بخش سوختگی (در ۲ تا ۱۶ ایزوله) و نیز در ایزوله های مربوط به بخش های ICU، داخلی و جراحی عمومی بترتیب در ۶، ۴ و ۲ ایزوله شناسایی شدند. بعد از برش آنزیمی با آنزیم های محدودالتر EcoRI و HincII در ۲۵ سویه ی پseudomonas آئروژینوزا محتوی یک یا دو پلاسمید، الگوهای برشی یکسان در ۸ سویه (۳۲٪) با EcoRI مشاهده شد درحالیکه با آنزیم HincII هیچگونه الگوی برشی مشابه حاصل نشد.

**نتیجه گیری:** نتایج این مطالعه نشانگر مقاومت آنتی بیوتیکی بالا و حضور پلاسمید در اکثر سویه های پseudomonas آئروژینوزا ایزوله شده از عفونت های مختلف بوده و تشابه زیادی در الگوهای پلاسمیدی و الگوهای برشی سویه های جدا شده از عفونت های بیمارستانی از بخش های سوختگی، ICU، داخلی و جراحی عمومی در یک زمان کوتاه بدست آمد که احتمال منشاء گرفتن این باکتری ها از یک کلون باکتریایی با شیوع بالای انتقال ژن را در بین سویه های بیمارستانی مطرح می سازد و نشانگر مفید بودن مطالعه الگوی پلاسمیدی در پseudomonas آئروژینوزا می باشد.

**واژه های کلیدی:** پseudomonas آئروژینوزا، الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی، الگوی پلاسمیدی، عفونت بیمارستانی



## مقدمه

پسودوموناس آئروژینوزا یکی از شایع ترین باکتری های گرم منفی است که در عفونت های بیمارستانی یافت شده و مقاومت آنتی بیوتیکی زیادی را نشان می دهد [۱].

این باکتری عامل عفونت های دستگاه ادراری، سیستم تنفسی، درماتیت، عفونت بافت های نرم، باکتریمی، عفونت استخوان و مفاصل و انواعی از عفونت های سیستمیک و بویژه در بیماران با سوختگی شدید، سرطان و ایدز که نقص ایمنی دارند می باشد [۲].

درمان این عفونت ها بخاطر حساسیت پایین ذاتی باکتری به آنتی بیوتیک ها و توانایی باکتری در کسب مقاومت بعدی به داروها در طول آنتی بیوتیک درمانی با شکست مواجه می شود [۳].

سویه های عامل عفونت های بیمارستانی برخلاف سویه های موجود در جامعه میزان بالایی از مقاومت نسبت به آنتی بیوتیک ها را نشان می دهند و اکثراً دارای مقاومت چندگانه هستند [۴]. همه گیر شناسی عفونت های پسودوموناس آئروژینوزا معمولاً "بوسیله آنالیز مارکرهای فنوتیپی شامل بیوتیپ، انواع سرولوژیک، تولید پیوسین، فازتایپینگ و الگوی حساسیت آنتی بیوتیکی مطالعه می شود. تایپینگ سویه ها برای شناسایی و ریشه کنی مخازن محیطی به اندازه پیشگیری از عفونت ها با استفاده از آنتی بیوتیک درمانی مهم است [۵].

تحقیقات مربوط به خالص سازی، تفکیک و تکثیر اسید نوکلئیک منجر به تکامل سیستم های ساب تایپینگ بر اساس اسید نوکلئیک شده است، این سیستم ها شامل آنالیز الگوی پلاسمیدی، آنالیز هضم با آنزیم های محدودالتر، ریپوتایپینگ، PFGE<sup>۱</sup> و PCR و آنالیز تعیین توالی اسیدهای نوکلئیک می باشد. آنالیز الگوی پلاسمیدی و برش DNA پلاسمیدی با آنزیم های آندونوکلئاز محدودالتر، از اولین و ساده ترین فنون بر پایه DNA است که در مطالعات همه گیر شناسی بکار گرفته شده اند. این روش الگوی پلاسمیدی سویه را تعیین می کند.

<sup>۱</sup> Pulsed Field Gel Electrophoresis

تعداد و اندازه پلاسمیدها اساس تشخیص سویه می باشد که سویه های منشأ گرفته از یک کلون دارای تعداد مشابه از پلاسمیدها بوده و اندازه آنها نیز مشابه خواهد بود [۷،۶].

هدف ما از این مطالعه تعیین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و پلاسمیدی سویه های پسودوموناس آئروژینوزا در عفونت های بیماران بستری شده در مرکز آموزشی و درمانی سینا در تبریز می باشد. برای انجام این مطالعه، بعد از جداسازی سویه ها از بیماران، تست سنجش حساسیت به آنتی بیوتیک ها برای یافتن اولین نشانه های تشابه یا تفاوت بین سویه ها انجام گرفت و بعد با استخراج پلاسمید و آنالیز آن و برش با آنزیم های آندونوکلئاز محدودالتر EcoRI و HincII الگوی برشی پلاسمیدهای ایزوله شده تعیین و با هم مقایسه شدند.

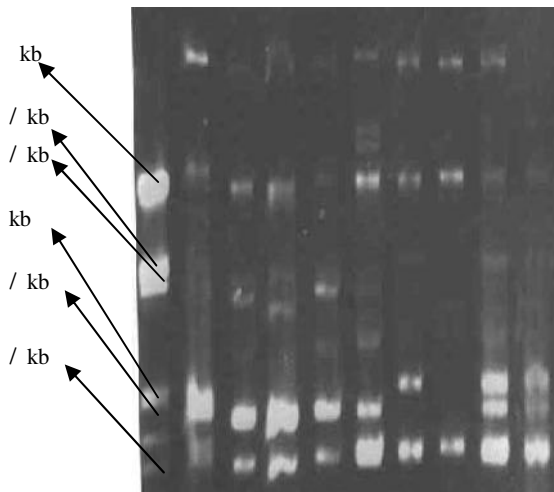
## روش کار

تعداد ۱۳۵ سویه پسودوموناس آئروژینوزا جدا شده از عفونت های مختلف در بیماران بستری شده در مرکز آموزشی و درمانی سینا در بخش های سوختگی (۸۵ سویه)، جراحی (۱۱ سویه)، داخلی (۱۹ سویه) و ICU (۲۰ سویه) در مدت ۱۳ ماه جمع آوری شدند.

کلیه سویه های جمع آوری شده با تست های مرسوم باکتریولوژیک در آزمایشگاه میکروب شناسی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز مورد تایید قرار گرفت. به منظور بدست آوردن الگوی حساسیت و مقاومت آنتی بیوتیکی سویه های جدا شده از بیماران، تست حساسیت به روش انتشار دیسک در آگار که بنام روش Kirby-Bauer شناخته شده است، انجام پذیرفت [۸]. در انجام تست حساسیت از ۱۲ دیسک آنتی بیوتیک شامل ایمی پنم (۱۰ میکروگرم)، آزترونام (۳۰ میکروگرم)، پیراسیلین (۱۰۰ میکروگرم)، سفنازیدیم (۳۰ میکروگرم)، جنتامایسین (۱۰ میکروگرم)، آمیکاسین (۳۰ میکروگرم)، توبرامایسین (۱۰ میکروگرم)، سیپروفلوکساسین (۵ میکروگرم)، کاربونی سیلین (۱۰۰ میکروگرم)، پلی میکسین (۳۰۰B واحد)، کولیسین (۱۰۰ میکروگرم) و آفلوکساسین

تمامی سویه ها در محیط کشت ستریمید آگار رشد کرده و در این محیط و مولر هینتون آگار مولد پیگمان بودند. کلیه سویه ها اکسیداز مثبت، کاتالاز مثبت، آرژنین دی هیدروژناز مثبت، رشد در  $42^{\circ}\text{C}$  مثبت، حرکت مثبت، قادر به اکسیده کردن گلوکز در محیط کشت OF<sup>۲</sup> و فاقد قدرت تخمیر قندها در محیط کشت TSI<sup>۳</sup> بودند. از کشت خالص باکتری آزمایش آنتی بیوگرام در مقابل ۱۲ ماده ضد میکربی بعمل آمد. میزان مقاومت سویه ها به آزترونام ۷۷٪، کولیستین ۷۴٪، سفنازیدیم ۶۹٪، پیراسیلین ۶۷٪، اوفلوکساسین ۶۲٪، توپراماسین ۵۶٪، کاربنی سیلین ۵۴٪، جنتاماسین ۵۱٪، سپیروفلوکساسین ۲۲٪، آمیکاسین ۱۵٪، پلی میکسین B ۱۳٪ و ایمی پنم ۲٪ بود. وزن مولکولی پلاسمیدها در کنار سایز مارکر DNA Lambda هضم شده با آنزیم های محدودالتر EcoRI و HindIII مورد بررسی قرار گرفت که عمدتاً در محدوده ۵ kb تا ۲۱ kb بودند. گرچه در برخی از سویه ها پلاسمیدهایی با وزن مولکولی بیش از ۲۱ kb نیز شناسایی شد (تصویر ۱).

۱ ۲ ۳ ۴ ۵ ۶ ۷ ۸ ۹ ۱۰



تصویر ۱. الکتروفورز DNA پلاسمیدی سویه های سودوموناس ترورینوزا ایزوله شده از بیماران مبتلا به عفونت زخم سوختگی در روی ژل آگارز ۰/۷٪. ستون های شماره (۳ و ۴) و (۹ و ۱۰) دارای الگوی پلاسمیدی مشابه و سایر ستون ها دارای الگوی پلاسمیدی متفاوت می باشند. خانه شماره ۱ مربوط به سایز مارکر DNA لامبدای هضم شده با آنزیم EcoRI و HindIII می باشد.

(۲ میکروگرم) (Mast, UK) استفاده شد. دیسک های آنتی بیوتیک را به کمک پنس در سطح آگار قرار داده و پلیت ها به مدت ۲۴-۱۸ ساعت در اتوکلاو  $37^{\circ}\text{C}$  قرار گرفتند. سپس قطر ناحیه مهار رشد باکتری اندازه گیری شده و طبق جدول استاندارد NCCLS<sup>۱</sup> واکنش سویه ها در مقابل هر دارو در سه دسته حساس، نیمه حساس و مقاوم طبقه بندی شد [۱۰،۹]. برای استخراج و خالص سازی DNA پلاسمیدی از روش لیز قلیایی تغییر یافته استفاده شد. تغییر داده شده در روش فوق شامل استفاده از مخلوط CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) و NaCl بعد از لیز باکتری و قبل از گرفتن رسوب DNA پلاسمیدی بود، که موجبات جداسازی کربوهیدرات ها را فراهم می سازد. برای الکتروفورز DNA پلاسمیدی از ژل آگارز ۰/۷٪ استفاده شد. بعد از تهیه ژل آگارز، ۵ میکرولیتر از محلول DNA پلاسمیدی خالص شده با ۱ میکرولیتر از بافر لودکننده حاوی ۲۵٪ بروموفنل بلو، ۲۵٪ گزیلین سیانول و ۳۰٪ گلیسرول در آب مقطر مخلوط گردیده و در چاهک موجود در ژل قرار داده شد. بعد از اتمام الکتروفورز ژل آگارز به مدت ۳۰ دقیقه در داخل آب مقطر محتوی ۰/۵ میکروگرم در میلی لیتر اتیديوم بروماید رنگ آمیزی شد. پس از رنگ آمیزی از نور اولتراویوله ۳۰۰ نانومتر برای شناسایی باندهای DNA استفاده شد. برای تعیین اندازه قطعات بدست آمده از سایز مارکر Lambda DNA هضم شده با آنزیم های محدودالتر EcoRI و HindIII استفاده شد [۱۲،۱۱]. جهت شناسایی باندهایی که بصور CCC، OC و خطی هستند از روش الکتروفورز دوبعدی استفاده گردید [۱۴،۱۳]. برش آنزیمی پلاسمیدها با استفاده از آنزیم های محدودالتر EcoRI و HincII مطابق دستورالعمل کارخانه سازنده (Fermentase) انجام گرفت.

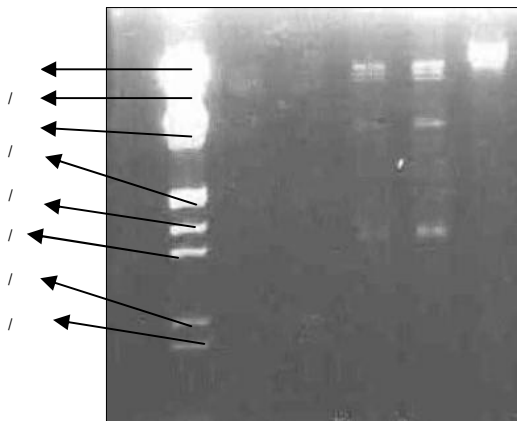
## یافته ها

<sup>۲</sup> Oxidation Fermentation

<sup>۳</sup> Triple Sugar Iron

<sup>۱</sup> National Committee For Clinical-Laboratory Standards

تعداد ۲۵ سویه دارای پلاسمید منفرد و یا دو تایی بدست آمده از بیماران با عفونت های مختلف تحت تاثیر آنزیم های محدودالتر *EcoRI* و *HincII* قرار گرفتند و الگوهای برشی آنها با یکدیگر مقایسه شدند که با آنزیم *EcoRI* در ۸ سویه (۳۲٪) الگوی مشابه بدست آمد. بعنوان مثال الگوی برشی مشابه بین دوسویه (به شماره های ۳۰ و ۲۵) که هر دو مربوط به عفونت زخم سوختگی بودند در اثر هضم با آنزیم محدودالتر *EcoRI* حاصل شد (تصویر ۲). ولی هیچگونه الگوی برشی مشابه در اثر هضم با آنزیم محدودالتر *HincII* در سویه های مذکور مشاهده نشد.



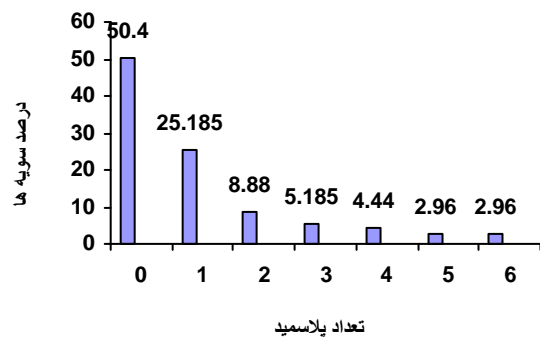
تصویر ۲. الگوی هضم آنزیمی سویه های دارای الگوی پلاسمیدی یکسان با آنزیم محدودالتر *EcoRI*. الگوهای مشابهی در ستون های ۴ و ۵ دیده می شود. ستون شماره ۱ مربوط به سایز مارکر DNA لامبدای هضم شده با آنزیم *EcoRI* و *HincIII* می باشد.

### بحث

پسودوموناس آئروژینوزا یک عامل مهم عفونت های بیمارستانی در افراد با ضعف ایمنی مثل مبتلایان به سرطان، فیبروز کیستیک و سوختگی می باشد. یکی از مهمترین جنبه های پزشکی پسودوموناس آئروژینوزا مکانیسم های مقاومت به تمام کلاس های آنتی بیوتیک های شناخته شده روتین می باشد [۱۵].

به منظور بدست آوردن الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی سویه ها از آمینوگلیکوزیدها ۳ دارو مورد استفاده قرار گرفت که توبرامایسین، جنتامایسین و آمیکاسین بودند. سویه های آزمایشی ۵۱٪ به جنتامایسین، ۵۶٪ به توبرامایسین و ۱۵٪ به آمیکاسین مقاومت نشان دادند. نتایج

با توجه به تداخل باندهای بدست آمده از یک سویه و تعلق آن به *OC* که از روش الکتروفورز دو بعدی استفاده شد باندهایی که در بعد دوم الکتروفورز با باند اول در الکتروفورز بعد اول مثلث تشکیل می دادند بعنوان *OC* شناسایی شده و از الگوی پلاسمیدی حذف شدند. از مجموع ۱۳۵ سویه ۶۸ سویه (۵۰٪/۴) فاقد هرگونه باند پلاسمیدی بودند و ۶۷ سویه (۴۹٪/۶) دارای پلاسمید بودند که تعداد پلاسمیدها از ۱ تا ۶ عدد متغیر بود (نمودار ۱).



نمودار ۱. تعداد پلاسمیدهای ایزوله شده از سویه های سودوموناس آزمایشی

بیشترین تعداد پلاسمیدها در سویه های جدا شده از عفونت های زخم سوختگی بود و نیز پلاسمیدهایی با وزن مولکولی زیاد در سویه های جدا شده از این بخش بیشتر بودند. ۸۲٪ از سویه های دارای پلاسمید، حضور پلاسمیدی با اندازه ۲۱ kb را نشان دادند. از مجموع ۶۷ سویه ی دارای پلاسمید ۲۸ الگوی پلاسمیدی بدست آمد. الگوهای مشابهی در بین سویه های جدا شده از بیماران بستری در بخش های مختلف و در یک بخش حاصل شد (جدول ۱).

جدول ۱. مقایسه الگوهای پلاسمیدی مشابه در یک بخش و در بین بخشها

الگوی پلاسمیدی	سوختگی	داخلی	جراحی	ICU
۲۱، ۲۱، ۲، ۱/۵ >	۴	.	.	.
>۲۱، ۲۱	۲	.	.	.
>۲۱	۲	.	.	.
۲۱، ۲/۵، ۲، ۱	۲	.	.	.
۲۱، ۲، ۱/۵	۲	.	.	.
۲۱، ۱/۵، ۱، ۲	۲	.	.	.
۲۱، ۱/۳۷	۲	.	.	.
۲۱	۱۶	۴	۲	۶
۵/۲، ۳/۵	۲	.	.	.
۴/۳ و ۳/۵	۲	.	.	.

مشابه و یا متفاوت در سایر مطالعات در ایران و سایر کشورها بدست آمده است، طبق مطالعات رستگار و همکاران میزان مقاومت سویه های ایزوله شده از بیمارستان سوانخ و سوختگی توحید تهران در سال های ۱۳۷۴ الی ۱۳۷۹، نسبت به آمیکاسین ۹۰٪ و در برابر جنتامایسین ۹۸٪ بوده است [۶].

در پژوهشی که توسط شکیبایی و همکاران در سال ۱۳۸۰ در دانشگاه علوم پزشکی کرمان در بیماران بخش سوختگی انجام شد میزان مقاومت به آمیکاسین و توبرامایسین به ترتیب ۸۵٪ و ۸۱/۲٪ گزارش شده است [۱۷]. در مطالعه انجام شده توسط کانلوگاری<sup>۱</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۳ میلادی در بیمارستانی در ترکیه که در عفونت های تنفسی انجام شد میزان مقاومت به جنتامایسین ۵۷/۵٪، توبرامایسین ۵۸/۴٪ و آمیکاسین ۵/۴٪ بوده است [۱۸].

میزان مقاومت سویه های ایزوله شده پسودوموناس آئروژینوزا در این مطالعه در بیماران بستری در بخش های مختلف در برابر سفالوسپورین نسل سوم مورد مطالعه که سفتازیدیم بود ۶۹٪ بدست آمد. طبق مطالعه مهاجری و همکاران در سال های ۱۳۸۳-۱۳۸۰ میزان مقاومت به سفتازیدیم در بیمارستان های دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه ۵۰٪ بود [۱۹]. در سال ۲۰۰۳ در بیمارستان های انگلستان میزان مقاومت به سفتازیدیم ۳۹٪ بود [۲۰]. میزان مقاومت سویه های جدا شده پسودوموناس آئروژینوزا در مطالعه حاضر در بیماران بستری در بخش های مختلف در برابر پلی میکسین های مورد مطالعه ما که پلی میکسین B و پلی میکسین E (کولیستین) می باشند به ترتیب ۱۳٪ و ۷۴٪ می باشد. در سال ۲۰۰۳ در اناگو نیجریه میزان مقاومت به کولیستین ۱۶/۲۵٪ بود [۲۱].

در پیتسبورگ<sup>۲</sup> روسیه طبق مطالعه رابرت<sup>۳</sup> و همکاران در سال ۱۹۹۶ میزان مقاومت به پلی میکسین B ۰/۴٪ و به کولیستین ۲/۶٪ گزارش شد [۲۲]. میزان مقاومت سویه

های پسودوموناس آئروژینوزا در مطالعه حاضر در برابر فلوروکینولون های مورد استفاده که سیپروفلوکساسین و افلوکساسین بودند به ترتیب ۲۲٪ و ۶۲٪ می باشد. در بخش سوختگی بیمارستان توحید تهران میزان مقاومت به سیپرو فلوکساسین در سال ۱۳۷۹-۱۳۷۵، ۸۵٪ بوده است. در یک بررسی دیگر در سال ۱۳۸۰ میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین ۶۸٪ بوده است [۱۶].

در بیمارستان های ترکیه طبق مطالعه آکوم<sup>۴</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۳ میزان مقاومت به سیپروفلوکساسین ۱۲/۵٪ و به افلوکساسین ۱۹/۹٪ گزارش شد [۲۳].

میزان مقاومت سویه های پسودوموناس آئروژینوزا مطالعه حاضر در برابر بتالاکتام های مورد استفاده یعنی ایمی پنم، پپراسیلین، کاربنی سیلین و آزترونام به ترتیب ۲٪، ۶۷٪، ۵۴٪ و ۷۷٪ ثبت شد. در بیمارستان های دانشگاه علوم پزشکی کرمان میزان مقاومت به کاربنی سیلین ۵۰٪ گزارش شده است [۱۷]. در بیمارستان های دانشگاه علوم پزشکی شیراز در سال ۱۳۷۶ میزان مقاومت به ایمی پنم ۱۱/۶٪، آزترونام ۳۵/۹٪ و پپراسیلین ۴۲٪ بود [۲۴]. در بیمارستان های یونان میزان مقاومت به ایمی پنم بطور متوسط ۳٪ و در مورد آزترونام ۲۷٪ و پپراسیلین ۲۶٪ گزارش شده است [۲۵]. در سال ۲۰۰۳ در سیواز ترکیه میزان مقاومت به پپراسیلین ۲۱/۸٪، آزترونام ۶۶/۶٪ و ایمی پنم ۲۱/۶٪ بوده است [۱۸].

خصوصیات فنوتیپی از قبیل الگوهای بیوشیمیایی، باکتریوفازتایپینگ، وجود آنتی ژن های سطحی سلول و الگوهای حساسیت ضد میکربی براساس تغییرات در شرایط رشد، مرحله رشد و جهش خودبخودی تمایل به تغییر دارند بنابراین استفاده از این خصوصیات برای شناسایی منبع عفونت و شیوع برای بررسی عفونت های ایجاد شده توسط گونه های هتروژن پسودوموناس آئروژینوزا مفید نخواهد بود. لذا استفاده از متدهای مولکولی نظیر PFGE و آنالیز الگوی پلاسمیدی در این مورد ضروری می باشد [۲۶-۲۸]. روش های متنوعی مثل

<sup>1</sup> Gunlugar

<sup>2</sup> Pittsburg

<sup>3</sup> Robert

<sup>4</sup> Algum

حاوی پلاسمید بودند [۳۴]. تعداد پلاسمیدهای جدا شده از سویه های مورد بررسی در این مطالعه از ۱ تا ۶ عدد بود. تعداد پلاسمیدهای موجود در هر سلول در مطالعه توسط عبیری و همکاران بین ۱ تا ۴ عدد و اکثراً ۳ عدد بود [۳۲]. تعداد باندهای پلاسمیدی در بیماران بخش سوختگی در بیمارستان های دانشگاه علوم پزشکی کرمان در سال ۱۳۸۰ طبق مطالعه شکیبایی و همکاران بین ۱ الی ۳ عدد بوده است [۱۷]. مطالعه میلیسمو و همکاران در ایتالیا در سال ۱۹۹۶ تعداد پلاسمیدها را از ۱ تا ۳ عدد نشان داد [۳۳]. در یک مطالعه دیگر در سال ۲۰۰۴ در آنکارا توسط آچیک<sup>۴</sup> و همکاران تعداد پلاسمیدها از ۱ تا ۴ عدد گزارش شد [۳۵]. اندازه پلاسمیدها در این مطالعه بطور عمده در محدوده ۱ kb تا ۲۱ kb بود با این حال در برخی از سویه ها پلاسمیدهایی با وزن مولکولی بیش از ۲۱ kb نیز شناسایی گردید. در بیمارستان های دانشگاه علوم پزشکی شیراز در سال ۱۳۷۶ وزن مولکولی پلاسمیدها بین ۲/۵ kb و ۳ kb گزارش شد [۲۴]. در نیجریه طبق مطالعه داینی<sup>۵</sup> و همکاران وزن مولکولی پلاسمیدها از ۶/۶ kb تا ۱۷/۴ kb بود [۳۶]. طبق مطالعه میلیسمو و همکاران در ایتالیا وزن مولکولی پلاسمیدها از ۱ kb تا ۲۳ kb بود [۳۳]. در این تحقیق از ۱۳۵ سویه مورد مطالعه ۲۸ الگوی پلاسمیدی بدست آمد. در تحقیق انجام شده توسط عبیری و همکاران تعداد الگوهای پلاسمیدی ۲۸ الگو گزارش شد که این مورد با تحقیق حاضر مطابقت کاملی دارد [۳۲]. در ترکیه بر طبق مطالعات آچیک و همکاران در ۶ سویه ۵ الگوی پلاسمیدی مختلف بدست آمد [۳۵].

هرناندز ز چاوز<sup>۶</sup> و همکاران در مکزیک گزارش کرده اند که در میان ۶۰ سویه ی آزمایشی، ۱۱ سویه دارای DNA پلاسمیدی بوده اند و ۵ الگوی پلاسمیدی بدست آمد [۳۷]. طبق مطالعه انجام شده در بیمارستان های نیجریه توسط داینی و همکاران پلاسمیدها در ۵ الگوی پلاسمیدی طبقه بندی شدند [۳۶].

روش Holmes and Quigley ، Kado and Liu ، روش تغییر یافته Holmes and Quigley (روش قبلی به اضافه یک مرحله استخراج با فنل - کلروفرم) و Birnboim and Doly برای استخراج پلاسمید از باکتری ها وجود دارد [۳۰، ۲۹].

در این پژوهش بدلیل سرعت روش، عدم نیاز به اولتراسانتریفیوژو قیمت نسبی ارزان، مقدار DNA استخراج شده و مناسب بودن آن برای هضم آنزیمی از روش لیز قلیایی تغییر یافته (جداسازی کربوهیدرات ها با مخلوط  $CTAB + NaCl$ ) استفاده شد. بعد از استخراج DNA از باکتری های تحت مطالعه برای شناسایی پلاسمیدهای بدست آمده از الکتروفورزدرژل آگارز استفاده شد. در آزمایش الکتروفورز پلاسمیدها در ۳ فرم  $ccc$ ،  $oc$  و خطی ممکن است دیده شوند که هر کدام باند مجزایی را در الکتروفورز ایجاد می کنند فرم  $ccc$  بخاطر فشردگی تر بودن سریع تر از دو فرم دیگر حرکت می کند و بعد از آن فرم خطی و در آخر فرم  $oc$  حرکت می کند [۳۱، ۱۶، ۱۵].

در این پژوهش برای افتراق باندهای مختلف و شناسایی دقیق تعداد پلاسمیدهای موجود در سویه های آزمایشی از روش الکتروفورز دو بعدی استفاده شد.

در این تحقیق الگوی پلاسمیدی سویه های پسودوموناس آئروژینوزا ی جدا شده از عفونت های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که ۴۹/۶٪ سویه های تحت مطالعه حاوی پلاسمید بودند. نتایج مشابه یا متفاوت نیز در سایر تحقیقات بدست آمده است. در مطالعه انجام شده در دانشگاه علوم پزشکی تهران توسط عبیری و همکاران DNA پلاسمیدی در ۶۲٪ از سویه های مورد مطالعه مشاهده شده است. [۳۲]. طبق مطالعه میلیسمو<sup>۲</sup> و همکاران در ایتالیا (۱۹۹۶)، ۴۵/۲٪ از سویه ها دارای DNA پلاسمیدی بودند [۳۳]. دریک مطالعه در چین که توسط زانگ<sup>۳</sup> و همکاران انجام گرفت ۴۵/۳٪ از سویه ها

<sup>4</sup> Açık

<sup>5</sup> Daini

<sup>6</sup> Hernandez-Chaves

<sup>1</sup> Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide

<sup>2</sup> Millesimo

<sup>3</sup> Zhang

### نتیجه گیری

نتایج این پژوهش و مقایسه آن با نتایج سایر مطالعات انجام شده نشان می دهد که مقاومت آنتی بیوتیکی بالا در سویه های پseudomonas آئروژینوزا مولد عفونت های مختلف بخصوص در عفونت زخم سوختگی وجود دارد. وجود الگوهای پلاسمیدی مشابه و نیز الگوهای برشی یکسان در سویه های جدا شده از بیماران بستری در بخش های مختلف در یک محدوده زمانی کوتاه نشان می دهد که احتمالاً این سویه ها از یک کلون باکتریایی منشأ گرفته اند و یا انتقال ژن در بین سویه های بیمارستانی با شیوع بالایی مطرح است.

### سپاسگزاری

این مقاله بخشی از نتایج طرح پژوهشی مصوب مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز است، که بدینوسیله از حمایت های مالی مرکز یاد شده و همکاری علمی آقایان دکتر مسگری و دکتر محمودپور قدردانی و تشکر می گردد

در مطالعه حاضر الگوهای پلاسمیدی مشابهی با تعداد ۳ و بیش از ۳ پلاسمید در سویه های جدا شده از بخش سوختگی بدست آمد که نشان دهنده ارتباط همه گیر شناسی آنهاست. زمانیکه تعداد پلاسمیدها کمتر از ۳ عدد باشد و اندازه پلاسمیدها نسبتاً بزرگ باشد قدرت افتراق الگوی پلاسمیدی کاهش می یابد و بایستی از فنون دیگری نظیر برش آنزیمی برای افتراق سویه ها استفاده کرد [۳۸]. در این پژوهش سویه های دارای پلاسمید منفرد و دوتایی با آنزیم های محدودالتر EcoRI و HincII برش داده شده و الگوهای برشی آنها بایکدیگر مقایسه شدند. بعنوان مثال الگوی برشی مشابه بین دو سویه ( به شماره های ۲۵ و ۳۰) که هر دو مربوط به عفونت زخم سوختگی بودند در اثر هضم با آنزیم محدود التر EcoRI بدست آمد ولی هیچ الگوی برشی مشابه در اثر هضم با آنزیم محدود التر HincII در سویه های مذکور مشاهده نشد. نتایج حاصل حاکی از تشابه الگوهای برشی در ۳۲٪ از سویه های بررسی شده با آنزیم های محدودالتر بود که از بخش های سوختگی و جراحی جدا شده بودند.

### References

- 1- De Freitas AL, Barth AL. Antibiotic resistance and molecular typing of *Pseudomonas aeruginosa*. focus on imipenem. *Braz J Infect Dis*. 2002 Feb; 6(1):1-7.
- 2- Sasaki M, Hiyama E, Takesue Y, Kodaria M, Sueda T, Yokoyama T. Clinical surveillance of surgical imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection in a Japanese hospital. *J Hosp Infect*. 2004 Feb; 56 (2): 111-18.
- 3- Bert F, Lambert-Zechovsky N. Antibiotic resistance patterns in *Pseudomonas aeruginosa*, An 8-year surveillance study in a French hospital. *Int J Antimicrob Agents*. 1997; 9: 107-112.
- 4- Tassios PT, Gennimata V, Maniatis AN, Fock C, Legakis NJ. Emergence of multidrug resistance in ubiquitous and dominant *Pseudomonas aeruginosa* serogroup O:11. The Greek *Pseudomonas Aeruginosa* study Group. *J Clin Microbiol*. 1998 Apr; 36(4): 897-901.
- 5- Poh CL, Yeo CC. Recent advances in typing of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Hosp Infect*. 1993 Jul; 24 (3): 175-81.
- 6- Tenover FC. Plasmid fingerprinting, A tool for bacterial strain identification and surveillance of nosocomial and community aquired infections. *Clin Lab Med*. 1985 Sep; 5 (3): 413-36.
- 7- Martin C, Boyd EF, Quentin R, Massicot P, Selander RK. Enzyme polymorphism in *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from cystic fibrosis patients in France. *Microbiology*. 1999 Sep; 145 (pt9): 2587-94.
- 8- Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a single disc method. *Am J Clin Pathol*. 1966 Apr; 45 (4): 493-6.
- 9- Mendoza MT. What's new in antimicrobial susceptibility testing. *Phil J Microbial Infect Dis*. 1998; 27(3): 113-115.



- 10- Cormican M, Whyte T, Hanahoe B. Antimicrobial susceptibility testing in Ireland: An introduction to the methods of the NCCLS. NUIG. 2005; 1-29.
- 11- Sentchilo VS, Perebitok AN, Zehnder AJ, Van der meer JR. Molecular diversity of plasmids bearing genes that encode toluene and xylene metabolism in *Pseudomonas* strains isolated from different contaminated sites in Belarus. *Appl Environ Microbiol*. 2000 Jul; 66(7): 2842-52.
- 12- Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: A laboratory manual*, volume 1, 3<sup>rd</sup> ed., New York: CSHL press, 2001; 1-34.
- 13- Hinterman G, Fischer HM, Cramer R, Hutter R. Simple procedure for distinguishing ccc, oc and l forms of plasmid DNA by agarose gel electrophoresis. *Plasmid*. 1981 May; 5 (3): 371-3.
- 14- Nahaie MR, Goodfellow M, Harwood CR. A rapid screening procedure for staphylococcal plasmids. *J Microbiol Meth*. 1984; 2: 73-81.
- 15- Holder IA, Volpel K, Ronald G, Paranchych W. Studies on multiple *Pseudomonas aeruginosa* isolates from individual burn patients by RFLP, O antigen serotyping and antibiogram analysis. *Burns*. 1995 Sep; 21(6): 441-4.
- 16- Rastegar Lari AR, Alaghehbandan R, Akhlaghi L. Burn wound infections and antimicrobial resistance in Tehran, Iran, an increasing problem. *Annals of Burns and Fire Disasters*. 2005; 11(9): 17-225.
- 17- Shakibaie MR, Adeli S, Nikian Y. Emergence of ciprofloxacin resistance among *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn patients. *Iranian Journal of Medical Sciences*. 2001; 26(3&4): 155-159.
- 18- Gonlugar U, Zahir Bakici M, Ozdemir L, Akkurt I, Icagasioglu S, Gultekin F. Retrospective analysis of antibiotic susceptibility patterns of respiratory isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in a Turkish university hospital. *Annals Clin Microbiol Antimicrob*. 2003; 2(5): 1-5.
- 19- Mohajeri P. Antibiotic susceptibility and resistance patterns of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from different clinical specimens in patients referred to the teaching hospitals in Kermanshah. 2005; available from [www.kums.ac.ir/majale behbood-7/Mohajeri.doc](http://www.kums.ac.ir/majale_behbood-7/Mohajeri.doc) (accessed July 2005).
- 20- Pitt TL, Sparrow M, Warner M, Stefanidou M. Survey of resistance of *Pseudomonas aeruginosa* from UK patients with cystic fibrosis to six commonly prescribed antimicrobial agents. *Thorax*. 2003 Sep; 58 (9): 794-6.
- 21- Ozumba U.C. Antibiotic sensitivity of isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Enugu, Nigeria. *African J Clin Experiment Microbiol*. 2003; 4(1): 48-51.
- 22- Dohar JE, Kenna MA, Wadowsky RM. In vitro susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* to commonly used otological antibiotics. *Am J Otol*. 1996 Mar; 17(2): 207-9.
- 23- Algum U, Arisoy A, Gunduz T, Ozbakkaloglu B. The resistance of *Pseudomonas aeruginosa* strains to fluoroquinolone group of antibiotics. *Ind J Microbiol*. 2004; 22(2): 112-114.
- 24- Farjadian S, Kaviani MJ, Ghaderi A. Molecular analysis of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from hospitalized patients in Shiraz. *Iran J Med Sci*. 1996; 21(3&4): 112-118.
- 25- Tsakris A, Pournaras S, Woodford N, Alepou MF, Babini GS, Douboyas G, Livermore DM. Outbreak of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1 carbapenemase in Greece. *J Clin Microbiol*. 2000 Mar; 38(3): 1290-2.
- 26- Hauser AR, Sriram P. Severe *Pseudomonas aeruginosa* infections. Tackling the conundrum of drug resistance. *Postgrad Med*. 2005 Jun; 117 (1): 41-8.
- 27- Foxman B, Riley L. Molecular epidemiology, focus on infection. *Am J Epidemiol*. 2001 Jun; 153(12): 1135-41.
- 28- Tenover FC, Arbeit RD, Georing RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections, a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Health care Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1997 Jun; 18(6): 426-39.
- 29- Holmes DS, Quigley M. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal Biochem*. 1981 Jun; 114 (1): 193-7.
- 30- Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol*. 1981 Mar; 145 (3): 1365-73.
- 31- Novick RP. *Plasmids*. *Sci Am*. 1980 Dec; 243(6): 102-4, 106,110 passim.

- 32- Abiri R, Shahcheraghi F, Feizabadi M M, Badami N, Shooraj F. Plasmid profiling of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn infections in patients hospitalized in shaheed Motahari burn and accident center of Tehran. *Burns*. 2003; 29: 547-551.
- 33- Millesimo M, de Intitis G, Chirillo MG, Musso T, Savoia D. *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, serotypes, resistance phenotypes and plasmid profiles. *Eur J Epidemiol*. 1996 Apr; 12(2): 1123-9.
- 34- Miao J, Zhang X, Li H. The clinical significance of *Pseudomonas aeruginosa* typing and R plasmid and DNA molecule hybridization in patients with cor pulmonale. *Zhonghua Jie He He Hu Xi Za Zhi*. 1995 Dec; 18(6): 357-9,383.
- 35- Açık L, Küüçükkaraarslan A, Çelebi A. Antibiotic susceptibility, plasmid profiles and rapid-PCR analysis of clinical *Pseudomonas aeruginosa* isolated from Turkey. 2005; Available from [w3.gazi.edu.tr/leyacik/rapid.htm](http://w3.gazi.edu.tr/leyacik/rapid.htm).
- 36- Daini OA, Ogbolu OD, Remocampus PMB, Ogunledun A. Quinolones resistance and R plasmids of some Gram- negative enteric bacilli. *Afr J Clin Experiment Microbiol*. 2005; 6(1): 14-20.
- 37- Corona-Nakamura AL, Miranda-Novales MG, Leanos-Miranda B, Portillo-Gomez L, Hernandez-Chavez A, Anthor-Rendon J and et al. Epidemiologic study of *Pseudomonas aeruginosa* in critical patients and reservoirs. *Arch Med Res*. 2001 May-Jun; 32 (3): 238-42.
- 38- Bertin A. Comparison of several procedures for plasmid profile determination in *Escherichia coli*.